Tome 56. nº 1. — Février 1949.

(Aus dem anatomischen Institut der Universität Zürich.)
Direktor : Prof. Dr. Gian Töndury

Beitrag zur Wirkung von Sexualhormonen auf die Primitiventwicklung von *Triton alpestris*

Die Beeinflussung der hormonalen Störung durch SH-Glutathion

von

B. CAGIANUT

Mit 2 Textabbildungen

INHALT

I. THEORETISCHER TEIL

EINLEITUNG

Hohe Verdünnungen von weiblichen wie männlichen Sexualhormonen beeinflussen tiefgreifend die normale Entwicklung von Amphibieneiern (Töndury, 1941). Männliche Sexualhormone stören den normalen Neurulationsvorgang. Es treten symmetrische und asymmetrische Defekte in der Medullarplattenanlage auf, die

in hohen Prozentsätzen zum Verlust des bilateral-symmetrischen Baues der Keime führen. Die eine Keimhälfte bleibt nach Beendigung der Gastrulation auf diesem Stadium stehen, während die andere Keimhälfte sich unabhängig weiterentwickelt, einen Medullarwulst auffaltet und im Innern Chorda- und Ursegmente ausdifferenziert. Die im Wachstum zurückgebliebene Seite weist eine stark verminderte Mitosenzahl auf.

Weibliche Sexualhormone wirken schon auf die Furchung ein. Sie heben das Teilungsvermögen einzelner Blastomeren in verschiedenen Zellstadien auf. Die ungeteilt gebliebenen Blastomeren zeigen zahlreiche Degenerationserscheinungen: Das Pigment, das normalerweise an der Zelloberfläche sich ansammelt, wandert gegen das Zellinnere aus; gleichzeitig werden die Zellgrenzen unscharf und lösen sich auf. Die Basophilie geht verloren und es kann zum Abstossen ganzer Plasmaklumpen kommen. Bei stärker geschädigten Keimen bleibt die Entwicklung frühzeitig stehen und die Keime degenerieren.

Untersucht man die Mitosenverhältnisse solcher Eier, so stösst man auf Störungen der normalen Kernteilung, welche mit Erhöhung der angewandten Konzentration zunehmen. Es handelt sich um Chromosomenverlagerungen, die besonders ausgesprochen während der Meta- und Anaphase zur Beobachtung gelangen. Morphologisch finden wir unregelmässige Anordnungen der Chromosomen in der Aequatorialplatte. Einzelne davon sind teils entfaltet, teils zeigen sie abnorme Schleifenbildung und -stellung. Ganze Chromosomen oder Chromatinhaufen liegen ausserhalb des Teilungsraumes. Nicht selten stösst man auf Verklebungen zwischen einzelnen Chromosomen, oder dann ist die Chromosomenzahl vermindert als Folge vorangegangener Teilungsstörungen. Die Ana- Telophasenschädigungen sind gekennzeichnet durch verspätetes Auseinanderweichen der Chromosomen, Verklebungen einzelner Chromosomen, Abknickung der Tochterspireme, die 90° erreichen kann. Oft bleiben zwischen den sich neu bildenden Tochterkernen Chromatinbrücken bestehen. Als Folge dieser Kernteilungsanomalien beobachtet man zahlreiche Abnormitäten der Arbeitskerne. Neben Zellen mit mehreren Kernen finden sich Chromatinverdichtungen, Pyknosen mit nachfolgender Fragmentation. Nicht selten sind Kerne mit zipfelartigen Fortsätzen, Neben- und Riesenkerne. Von Interesse ist die unabgeklärte

Beobachtung, dass weibliche Sexualhormone bereits auf die Mitosen der frühen Furchungsstadien einwirken, während Testosteron nur Gastrulation und Neurulation verändert. Auf frühere Stadien scheinen männliche Sexualhormone keinen Einfluss zu haben.

Aehnliche Veränderungen des Kernteilungsmechanismus stellen wir auch in Gewebskulturen von Kaninchenfibrozyten fest, die mit Sexualhormonen behandelt wurden (v. Möllendorff, 1939). Bei ungestörtem Mitosenablauf und Teilungsrate weisen mit zunehmender Konzentration die späten Metaphasen gehäuft Chromosomenabsprengungen auf. Bei hohen Konzentrationen, welche eine zusätzliche Verlängerung der Zellteilung bewirken, treten auch Anaphasenstörungen hinzu, die morphologisch mit den an Keimen beobachteten Störungen übereinstimmen.

Unter den chemischen Gruppen, die in der Entwicklung schon frühzeitig nachweisbar sind und eine Rolle beim Entwicklungsgeschehen zu spielen scheinen, nehmen die SH-Gruppen einen bedeutenden Platz ein. Nach Auflösung des Kernbläschens und Bildung des Richtungskörperchens beim Tritonei gibt die Region des animalen Pols eine starke Reaktion auf SH-haltige Substanzen. Vor der ersten Furchung sind sie vor allem noch im Bereiche des grauen Halbmondes nachweisbar. Die Frage der Möglichkeit einer Identität mit der „leichten Substanz“ ist wohl gestellt, aber nicht beantwortet worden. Während der Furchung nehmen die SH-Proteine zu. Sie finden sich besonders in den Zellwänden der jungen Blastulazellen. Nach der von Schönmann (1938) aufgedeckten Phase der Kerngrössenabnahme in der jungen Blastula geben die Kerne eine stärkere Reaktion auf SH-Gruppen als vorher. Während der Gastrulation lassen sich SH-Gruppen auf der dorsalen Keimseite nachweisen mit einem Maximum im Bereiche des Umschlagrandes der dorsalen Urmundlippe. Sie erstrecken sich auch auf das Urdarmdach. In der Neurula sind es vorzüglich Chorda- und Somitenblastem, die eine Reaktion auf SH-Gruppen geben. Die Verteilung der SH-Proteine während der Gastrula scheint den topogenetischen Tendenzen zu entsprechen, während im Neurulationsstadium ein Gefälle an SH-Proteinen im Chordamesoderm besteht, das mit dem morphogenetischen Potential übereinstimmt (Lehmann, 1945).

SH-Gruppen sind ebenfalls mit der Zellteilung in Zusammenhang gebracht worden.

Nach HAMMETT (1929), VÖGTLIN und CHALKLEY (1935), MILLER und REIMANN (1940) wird die Zellteilung durch SH-Glutathion oder durch Zystein gefördert, ebenso nach OWEN, WEISS und PRINCE (1938) das Wachstum und die Regeneration. Eingehende Arbeiten auf diesem Gebiet verdanken wir RAPKINE (1938). Dieser Autor wies nach, dass während der Frühentwicklung der Gehalt an SH-Glutathion sich mit dem Teilungsgeschehen verändert und kurz vor jeder Mitose ein Maximum erreicht. Es ist dann HOPKINS (1938) gelungen aufzuzeigen, dass unter physiologischen Bedingungen reduziertes Glutàthion in der Lage ist, unter Wasserstoffabgabe S-S Bindungen zwischen Polypeptidketten zu sprengen, und dass oxydiertes Glutathion unter Wasserstoffaufnahme SH-Gruppen der Proteine oxydieren kann. Weiter wurde bekannt, dass verschiedene Enzyme, für deren Wirksamkeit freie oder gebundene SH-Gruppen notwendig sind, durch Glutathion beeinflusst werden können. So werden Triosephosphatdehydrase, Kathepsin, verschiedene Peptidasen, Succinodeydrase, Urease und Cholinesterase durch Ueberschuss von Glutathion inaktiviert (BRACHET, 1944). Das Glutathion nimmt als Redoxsystem mit hohem Potential im Zelleben eine wichtige Stellung ein. Neben der Beeinflussung verschiedener Fermentsysteme wirkt es als Teilregulator des Wasserstoffgewebedruckes und vermag durch Lösung oder Neubildung einzelner Haftpunkte im Grundgerüst des Protoplasmas dessen Viskosität weitgehend zu verändern. Auch die Entfaltung oder Aufknäuelung der Polypeptidketten kann teilweise auf die Bildung oder Lösung von S-S Brücken zurückgeführt werden. Solche lokale Viskositätsänderungen sind mit dem Teilungsgeschehen eng verbunden. Sie führen zur Ausbildung des Mixoplasmas und der Teilungsspindel. Kernsaft, Kernmembran und Spindel zeichnen sich durch eine stark positive Reaktion auf Nitroprussidnatrium aus (BRACHET, 1944), welche die Anwesenheit von freien schwefelhaltigen Gruppen beweist. RAPKINE (1938) hat deshalb die Aenderung im Gehalt an SH-Gruppen während der Teilung in Zusammenhang gebracht mit einer reversiblen Denaturierung der Plasmaproteine, wie sie durch die Arbeiten von ANSON und MIRSKY (1929) bekannt wurde.

Einzelne cancerogene Verbindungen, die den Sterinderivaten strukturell nahestehen, konnten in vitro mit SH-Gruppen zur Reaktion gebracht werden (WOOD u. FIESER, 1940). Gewisse

Beobachtungen lassen vermuten, dass dies auch in vivo möglich ist. Blockiert man die freien SH-Gruppen in der Haut durch eine Behandlung mit Yperit, so erzeugt die Pinselung der Haut mit krebserregenden Kohlenwasserstoffen kein Hautcarcinom mehr (BERENBLUM, 1935). Wir wissen ferner aus früheren Untersuchungen, dass die Wirksamkeit der Sexualhormone an das Vorhandensein einer Doppelbindung gebunden ist, deren Hydrierung die Wirkung aufhebt. Auch kann der schädigende Einfluss dieser Hormone durch Zusatz von Verbindungen, die Wasserstoff abzugeben vermögen wie z. B. Vitamin C, weitgehend abgeschwächt werden (MÖLLENDORFF, 1943).

Durch diese experimentellen Tatsachen angeregt, haben wir versucht die Frage abzuklären, ob die durch Sexualhormone hervorgerufene Schädigung von Wachstum und Entwicklung auf einer Beeinflussung der freien SH-Gruppen beruht. Durch abgestufte Zugaben von SH-Glutathion suchten wir den Effekt von Oestradiol und Stilboestrol auf die Eientwicklung von *Triton alpestris* zu hemmen. Als Kriterium wählten wir die für diese Hormone spezifischen Mitosenschädigungen.

METHODIK

Als Untersuchungsmaterial dienten uns Eier von *Triton alpestris*, die wir sofort nach dem Ablaichen sammelten. Sie wurden enthüllt und ungeteilt oder im Beginn der Gastrulation der Einwirkung von Oestradiol und Stilboestrol ausgesetzt. Ausgehend von einer 1%igen alkoholischen Lösung brauchten wir für alle Verdünnungen gewöhnliches Brunnenwasser. Sämtliche Verdünnungen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellt. Die übrigen Versuchsanordnungen sind früher eingehend beschrieben worden (TÖNDURY 1941). Auch haben wir stets auf gleiche Besiedlungsdichte geachtet. Als Kontrollen wurden jeweils gleichaltrige Keime unter denselben Aussenbedingungen in Brunnenwasser, in einer Glutathionlösung entsprechender Konzentration und in Hormonverdünnungen allein gehalten. Die Temperatur betrug mit Ausnahme einer einzigen Versuchsserie 20°. Für Glutathion stand uns ein kristallisiertes Praeparat der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung. Um die Beständigkeit dieser Verbindung in Brunnenwasser von pH 6,8-7,2 zu prüfen, habe ich verschiedene Mengen SH-Glutathion in Brunnenwasser gelöst und an der Luft stehen gelassen [1]. Nach verschie-

[1] S. experimenteller Teil *a)*.

denen Zeiten wurden Proben entnommen und mit verdünnter Jodlösung gegen Stärke titriert. Innerhalb 4 Tagen bilden sich nur Spuren der Disulfidverbindung. Die mit der Zeit sich ansammelnden Stoffwechselprodukte können bei geringer Besiedlungsdichte in ihrer Einwirkung auf das pH vernachlässigt werden. Die Eier wurden nach verschiedenen Zeitabschnitten in Bouin fixiert, über Methylbenzoatcelloidin in Paraffin eingebettet und geschnitten. Schnittdicke 12 μ. Schnittfärbung: Feulgen, Nachfärbung mit Wasserblau.

Zur Auswertung habe ich für jeden Keim die Mitosenverhältnisse quantitativ bestimmt. Die Mitosenbilder habe ich in 4 Stadien eingeteilt: Pro-, Meta-, Ana- und Telophase. Unvollständige Mitosenbilder suchte ich bei Durchsicht der folgenden Schnitte zu vervollständigen. Unklare und unbestimmbare Bilder wurden nicht mitgezählt. Dadurch entsteht eine gewisse Willkür in der Auswertung, die jedoch kaum auszumerzen ist. Die pathologischen Formen wurden in ein Schema eingetragen, was die Lokalisation und die Häufigkeitsverteilung dieser Formen zu untersuchen gestattet. Bei der differenzierten Mitosenauszählung wurden Kopf- und Rumpfregion gesondert ausgezählt und das Verhältnis der Mitosenzahlen beider Keimhälften für jeden Keim bestimmt. Dies sollte die bessere Erfassung lokalisierter Schädigungen ermöglichen. Wichtige Unterschiede einzelner Mittelwerte habe ich statistisch gesichert. Bei der Durchmusterung der einzelnen Keime wurde ferner auf den Entwicklungsgrad, auf das Verhalten der Ruhekerne und auf plasmatische Verhältnisse geachtet und zum Vergleich stets die Kontrollkeime mitberücksichtigt.

VERSUCHE

In einer ersten Versuchsserie haben wir gesunde befruchtete, noch ungeteilte Eier von Triton alpestris der Einwirkung einer Stilboestrolkonzentration 1 : 800 000 ausgesetzt unter gleichzeitiger Zugabe einer SH-Glutathionlösung 1 : 80 000. Als Kontrollen wurden weitere Eier im gleichen Stadium in Brunnenwasser, in SH-Glutathion 1 : 30 000 und in Stilboestrol 1 : 800 000 gezüchtet.

Die Keime wurden nach 20 Stunden als Morulae fixiert. Aeusserlich kam es bei den Stilboestrolkeimen vereinzelt zu unregelmässiger Furchung, welche aber sich im Laufe der Weiterentwicklung zum Teil normalisierte. Die übrigen Keime entwickelten

sich äusserlich normal. Die Schnittuntersuchung ergibt für die Mitosenverhältnisse keine sicheren Unterschiede zwischen den Stilboestroleiern und den Keimen, die mit Hormon und zusätzlich mit SH-Glutathion behandelt worden sind. Chromosomenverlagerungen sind in beiden Fällen in ungefähr gleichem Ausmasse festzustellen. Die Mitosenzahl ist jedoch zu gering, um daraus Schlüsse zu ziehen. Die Hormonkeime zeigen teilweise eine deutliche Asynchronie der Teilungsschritte, wobei im gleichen Keim Mitosen in verschiedenen Teilungsstadien beobachtet werden können. Klarer liegen die Verhältnisse, wenn man die Schädigungen des Zellplasmas vergleicht. Man hat hier den Eindruck, dass die Behandlung mit SH-Glutathion eine gewisse Schutzwirkung ausübt. Die bei den Hormonkeimen beobachtete und für dieselben charakteristische Pigmentauswanderung tritt hier stark zurück und ist auch lokal mehr eingeschränkt. Es kommt weniger häufig zu Plasmaaustritten und zu oberflächlicher Vacuolenbildung. Die Zellgrenzen sind scharf gezeichnet und gut abgesetzt. Die Furchungshöhle zeigt einen unregelmässigen Umriss, ihre Decke ist etwa 2—3 Zellen dick. Selten stösst man auf Verwaschung oder beginnende Auflösung der Zelloberfläche. wie sie für Hormonkeime typisch ist. Die Spindeln sind in allen Fällen gut ausgebildet. Während bei den Stilboestroleiern die einzelnen Blastomeren in der Grösse oft stark verschieden sind, tritt das bei den zusätzlich mit Glutathion behandelten Keimen viel seltener auf. Ein grösserer Entwicklungsrückstand ist nicht zu beobachten, in einzelnen Fällen ist die Entwicklung gegenüber den Kontrollen sogar etwas voraus. Die Dotterplättchen sind überall normal ausgebildet. Die SH-Glutathionkontrollkeime weisen in der Hauptsache eine geringe Beschleunigung der Entwicklung auf. Im übrigen stimmen sie im Schnittbild mit dem Wasserkontrollen überein.

Weitere Eier wurden im Gastrulationsstadium fixiert [1]. Aeusserlich verlief bei allen Keimen der Beginn der Gastrulation normal. Einzig die Hormonkeime wiesen eine Verzögerung der Urmundbildung auf. Auffällig war dabei die Pigmentballung an einzelnen Stellen. Die mit SH-Glutathion behandelten Hormonkeime zeichneten sich gegenüber den Wasserkontrollen ebenfalls durch eine leichte Verlangsamung des Gastrulationsbeginnes aus. Im übrigen

---

[1] S. experimenteller Teil *b)*.

verlief die Entwicklung normal. Die Schnittuntersuchung zeigt, dass bei den behandelten Hormonkeimen wie bei den unbehandelten die durchschnittliche Mitosenzahl zurücksteht, was den schon äusserlich sichtbaren Wachstumsstopp erklärt. Dieses Sinken der Teilungsrate wird zum Teil durch eine Verlangsamung des Mitosenablaufes maskiert, wie sie für Sexualhormone typisch ist. Die Betrachtung der Phasenprozentsätze zeigt eine mässige Verlängerung der Metaphase für die nicht behandelten und eine leichtere für die behandelten Hormonkeime. Interessant ist die gute Schutzwirkung des SH-Glutathion gegen die hormonspezifischen Chromosomenabsprengungen. Der Prozentsatz der Metaphasenstörungen fällt von 27,0 auf 15,5% derjenige der Ana-Telophasenstörungen von 29,4 auf 18,8%. Dieser teilweisen Schutzwirkung entspricht das Verhalten der Ruhekerne unter SH-Glutathionbehandlung. Bei Durchmusterung der Schnittserien behandelter Hormonkeime finden wir seltener Pyknosen, Fragmentierungen, Kerne mit Zipfeln. Riesen- und Nebenkerne sind weniger häufig als bei Hormoneiern. Die Lokalisation der pathologischen Mitoseformen bietet kein einheitliches Bild. Sie fällt im allgemeinen mit den Stellen stärkster Teilungsaktivität zusammen. Auch die Schädigung des Zellplasmas wird durch SHG-Zusatz stark eingeschränkt. Bemerkenswert ist das Fehlen der sonst für das Hormon typischen Pigmentverlagerung in das Zellinnere. Auch die übrigen plasmatischen Degenerationserscheinungen wie Ausbleiben der Bildung des Mixoplasmas, Auflösung der Zellgrenzen und Abstossen ganzer kernloser Plasmateile treten weithin zurück. Den stärksten Entwicklungsrückstand beobachten wir bei den behandelten Hormonkeimen. Die unbehandelten Hormoneier stehen in ihrer Entwicklung nur wenig hinter den Kontrollen zurück. Während bei diesen das Material der dorsalen Urmundlippe über die Keimhälfte nach vorn eingerollt wurde und das Blastocoel fast erreicht, steckt der Gastrulationsvorgang bei den behandelten wie unbehandelten Hormonkeimen noch in den Anfängen, obgleich in allen Fällen die Furchungshöhle gut ausgebildet ist. Die SH-Glutathionkontrollen haben sich vollkommen normal entwickelt.

Die Neurulation verlief bei den allermeisten Keimen makroskopisch normal [1]. Vereinzelt kam es zu Schwierigkeiten in der Aus-

[1] S. experimenteller Teil *e)*.

bildung und Auffaltung eines Medullarwulstes bei den Stilboestrolkeimen, Diese wurden jedoch überwunden und die Auffaltung wurde nachträglich regelrecht durchgeführt. Auf dem Schnittbild erkennt man das Neuralrohr, das sich bei den Wasserkontrollen eben geschlossen hat. Es ist von der Chorda, die sich aus dem Urdarmdach ausgesondert hat, unterlagert. Die flügelartigen Fortsätze des dorsalen Mesoderms zeigen die ersten Ansätze der Ursegment bildung. Das Hirnrohr weist bereits die ersten Andeutungen der primären Augenblasen auf. Fehlleistungen der Entwicklung lassen sich auf dem Schnitt bei den meisten Hormonkeimen nachweisen Wohl hat sich das Neuralrohr überall geschlossen, doch fehlt bei vielen Neurulae die zentrale Lichtung. Das Kaliber des Neuralrohres ist viel schmächtiger als bei den Kontrollen. Es wird bei allen Keimen von der Chorda unterlagert, welche zum Teil aber noch mit dem Urdarmdach in Verbindung steht. Weiterhin fällt die geringe Ausdehnung des dorsalen Mesoderms auf. Die mit SH-Glutathion behandelten Hormoneier stehen in ihren Entwicklungsleistungen zumeist auf der Stufe der Kontrollkeime. Vereinzelte Keime zeigen eine rudimentäre Ausbildung der Ursegmentanlage.

Untersucht man die Mitosenverhältnisse, so fällt uns bei den behandelten Hormonkeimen ein gewisses Sinken der Teilungsrate auf, welche wohl Ursache der leichten Entwicklungshemmung ist. Auch hier finden wir weniger Chromosomenabsprengung als bei den unbehandelten Hormonkeimen. Dieser Schutzeffekt wirkt sich ebenfalls auf den Ablauf der Mitose aus, indem die typische Verlangsamung der Metaphase z. T. wenigstens aufgehoben wird. Der Anteil pathologischer Aequatorialplatten fällt von 35,8 auf 8,7% und derjenige der Ana-Telophasenstörungen von 10,6 auf 0,6%. Topographisch fallen auch hier die pathologischen Mitosenformen mit den Stellen grösster Teilungstätigkeit zusammen. Sie betreffen vorwiegend das Nervensystem. Vergleicht man die durchschnittliche Mitosenzahl in Kopf- und Rumpfgebiet so fällt eine gewisse Dissoziation im Teilungsrhytmus auf, welche sonst besonders bei den mit Hormon behandelten Eiern zu beobachten ist. Das Verhalten der Ruhekerne und des Zellplasmas entspricht der Häufigkeit der pathologischen Mitosebilder. Wo pathologische Mitosen vorherrschen, können wir auch gehäuft abnorme Ruhekerne und vereinzelte Plasmaschädigungen feststellen.

SH-Glutathion-Stilboestrolkeime wurden nach 96 Stunden fixiert[1]. Diese Keime haben sich bis zum Gastrulationsbeginn entwickelt. Noch erfolgt die Urmundbildung und der Beginn der Einrollung des dorsalen Urmundlippenmaterials. Dann wurde trotz gut ausgebildetem Blastocoel die weitere Entwicklung gestoppt. Als Ursache dieser Stoppwirkung zeigt uns das Schnittbild einen fast absoluten Stillstand der Teilungstätigkeit. Auffällig ist dabei der verhältnismässig kleine Anteil abnormer Metaphasen. Mit 10,6% ist er nur wenig höher als bei den Wasserkontrollen. Unverkennbar ist dagegen die Verlängerung des Bestandes der Aequatorialplatte, die bei der differenzierten Mitosenauszählung mit 88,2% figuriert. Die Ruhekerne zeichnen sich durch eine schwache Feulgen-Reaktion aus.

Das Verhalten des Oestradiols unter Zusatz von SH-Glutathion haben wir an Keimen untersucht, die nach 60 Stunden fixiert wurden[2]. Die angewandte Oestradiolkonzentration betrug in diesem Falle 1: 300 000, der Glutathionzusatz 1: 30 000. Makroskopisch verlief bei den Kontrollkeimen Furchung und Gastrulation normal, die Hormonkeime dagegen ebenso wie die mit Glutathionzusatz behandelten Eier, wiesen grosse Entwicklungsrückstände auf. Die Schnittuntersuchung der Kontrollen zeigt ein fast geschlossenes Neuralrohr, das von einer wohl ausgebildeten strangförmigen Chorda unterlagert wird. Das dorsale Mesoderm ist im Begriffe, die Ursegmente zu bilden. Ein einziger Kontrollkeim hinkt in der Entwicklung wenig nach und befindet sich erst im Stadium der Medullarplattenausbildung. Die Glutathionkontrollen weisen teilweise die gleiche Entwicklungsstufe auf, teilweise ist ihr Wachstum leicht verzögert. Der Grossteil der Hormonkeime hat die Gastrulation nicht beenden können. Es fehlt die Furchungshöhle. Ruhekerne, Mitosen und Zellplasma sind stärkstens geschädigt. Vereinzelte Eier haben zwar die Gastrulation beendet, sie sind im Begriffe die Neuralrinne auszubilden. Weitere Keime zeigen gegenüber den Kontrollen keinen Wachstumstückstand, doch sind Ursegmentanlagen wie Chorda dorsalis rudimentär ausgebildet. Die mit Glutathion behandelten Oestradioleier sind in ihrer Entwicklung noch stärker gehemmt. Ursache dieser

[1] S. experimenteller Teil *d)*.
[2] S. experimenteller Teil *e)*.

Wachstumsverzögerung ist ein fast vollständiger Stopp der mitotischen Aktivität. Dieser Mitosenstopp führt sekundär zur Degeneration und zum Absterben der Keime. Er kann auf verschiedener Entwicklungsstufe erfolgen. Eine quantitative Untersuchung der Mitosenbilder ist in diesem Falle nicht möglich, weil die absoluten Mitosenzahlen zu niedrig sind. Bemerkenswert ist jedoch, dass die plasmatischen Schädigungen trotz stärkster Wachstumshemmung nicht den Grad der Hormonkeime erreichen.

Nach 70 Stunden bietet sich prinzipiell kein neues Bild. Die Keime, die in einer Oestradiollösung 1: 500 000 z. T. unter Zusatz von Glutathion 1: 50 000 gehalten wurden, haben Furchung und Gastrulation überstanden [1]. Aeusserlich verlief der Beginn der Neurulation bei einzelnen dieser Eier verzögert. Zum Teil kam es zu asymetrischer Ausbildung der Medullarwülste, welche sich jedoch nachträglich korrigierte. Bei der Durchsicht der Schnittserien stellen wir fest, dass die Kontrollkeime den Schluss des Neuralrohres grösstenteils beendet haben. Chorda und Ursegmente haben sich differenziert. Die Glutathionkontrollen weisen eine leichte Verzögerung der Entwicklung auf. Die behandelten Hormonkeime stehen in ihrer Entwicklung noch weiter zurück. Die Medullarwülste beginnen sich erst aufzufalten, vereinzelt besteht noch die Rückenrinne, das dorsale Mesoderm zeigt noch keine Gliederung und die Chorda dorsalis ist bei einzelnen Keimen noch im Urdarmdach eingeschaltet.

Ueberprüft man die Mitosenverhältnisse, so fällt auch hier eine gewisse Schutzwirkung des Glutathions auf, indem der Prozentsatz pathologischer Metaphasen unter Glutathioneinwirkung von 39,0 auf 21,0% absinkt. Auch die Verlängerung der Mitosendauer, die unter Oestradioleinwirkung zu beobachten ist, wird durch SH-Glutathionzusatz zurückgedrängt. Dass dabei die Entwicklung trotzdem noch stärker gehemmt wird, kann wohl dem Umstande zugeschrieben werden, dass die absolute Mitosenzahl sinkt und gleichzeitig eine Dissoziation im Teilungsrhythmus zwischen Kopfteil und Rumpfregion einsetzt. Für die Ruhekerne gilt auch hier das früher gesagte. Parallel mit dem Absinken der pathologischen Mitosenformen finden sich auch nach SH-Glutathionzugabe weniger abnorme Ruhekernformen.

---

[1] S. experimenteller Teil *f)*.

Weitere Keime wurden nach 84 Stunden fixiert [2]. Aeusserlich verliefen Furchung und Gastrulation normal. Die Entwicklung aller dieser Keime war im ganzen gesehen ziemlich langsam. Das Schnittbild zeigt bei allen Wasserkeimen eine beginnende Einsenkung der Medullarplatte und dem Verschluss des Neuralrohres. Die Chorda dorsalis hat sich allseitig abgesetzt und bildet einen geschlossenen Strang. Das dorsale Mesoderm hat sich weitgehend segmentiert. Die Oestradioleier, welche in einer Konzentration 1 : 400 000 gezüchtet worden waren, haben teilweise die gleiche Entwicklungsstufe erreicht, teilweise ist der Verschluss des Neuralrohres noch nicht überall vollständig. Die Ausbildung des dorsalen Mesoderms ist stellenweise mangelhaft. Das eingesenkte Neuralrohr weist bei einzelnen Eiern kein zentrales Lumen auf. Zusätzliche Behandlung mit SH-Glutathion bessert den Entwicklungsrückstand kaum.

Die durchschnittlichen Mitosenzahlen weisen bei den einzelnen Keimen keine grösseren Unterschiede auf, ebenso wenig die Verhältnisse der Teilungsaktivitäten zwischen Kopf- und Rumpfregion. Die Mitosen laufen in allen Teilen ziemlich gleichmässig ab. Einzig der Prozentsatz der pathologischen Formen findet sich bei den Oestradiolkeimen wesentlich höher als bei den übrigen Kontrollen. Diese starke Anhäufung abgesprengter und verlagerter Chromosomen während der Metaphase wird durch zusätzliche Behandlung solcher Keime mit SH-Glutathion von 29,2 auf 8,7% gesenkt. Die Lokalisation der pathologischen Mitosen bevorzugt eindeutig das Nervensystem und geht auch hier den Stellen grösster Teilungsintensität parallel. Die Stilboestrolkeime, die nach der gleichen Zeit fixiert wurden, zeigen das nämliche Verhalten. Die durch das Hormon bewirkte sehr leichte Entwicklungshemmung wird durch SH-Glutathion teilweise aufgehoben, wobei insbesonders der Prozentsatz pathologischer Metaphasen von 30,7 auf 9,9% herabgedrückt wird. Auch der beginnende Mitosenstopp, den wir bei den Stiboestrolkeimen beobachten können und der sich in einer Verlängerung der Metaphase und im Ansteigen der absoluten Mitosenzahl und Aenderung des Verteilungsquotienten zwischen Kopf- und Rumpf zu erkennen gibt, wird durch SH-Glutathionzugabe fast völlig aufgehoben.

---

[2] S. experimenteller Teil *g)*.

Die Keime, die wir nach 100 Stunden fixiert haben, hatten sich sehr langsam entwickelt [1]. Die Medullarplatte der Wasserkontrollen hat sich vom übrigen Ektoderm scharf gesondert und beginnt erst sich einzusenken. Der Schluss der Medullarwülste ist nicht vollständig durchgeführt. Die Chorda besteht als selbständiger Strang. Das dorsale Mesoderm hat sich abgesondert und ist stellenweise zweischichtig geworden. Von den behandelten Hormonkeimen steht ein Teil bei der Ausbildung der Medullarplatte und der ersten Aussonderung des Mesoderms. Die übrigen haben mit der Auffaltung der Medullarwülste bereits begonnen. Sie stehen im Entwicklungsrückstand gegenüber den Kontrollkeimen, im Vorsprung jedoch gegenüber den reinen SH-Glutathioneiern. Diese haben zur Hälfte die Gastrulation noch nicht beendet und besitzen noch ein ausgedehntes Blastocoel. Die übrigen bilden erst ihre Medullarplatte aus und beginnen mit der Auffaltung der Medullarwülste. Sämtliche Oestradiolkeime sind im Gastrulationsstadium eingegangen.

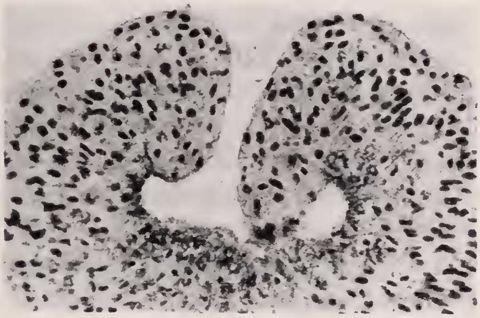


FIG. 1.
Stilboestrol 1 : 800.000
84 h
Keim C_{12} Serie g

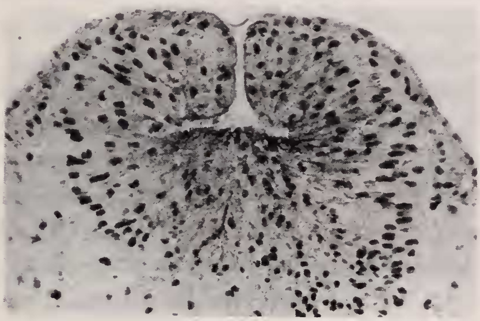


FIG. 2.
Stilboestrol 1 : 800.000
SH. Gluthathion 1 : 80.000
84 h
Keim D_8 Serie g

In 17,3% aller Metaphasen finden sich bei den behandelten Oestradiolkeimen abgesprengte Chromosomen. Es darf angenom-

[1] S. experimenteller Teil *h)*.

men werden, dass der Prozentsatz abnormer Mitosen bei den Hormonkeimen wesentlich höher ausgefallen wäre. Das Verhalten von Teilungsrate und Mitosenzahlen in Kopf und Rumpf weicht nicht wesentlich von früheren Versuchsserien ab.

Die übrigen Eier wurden erst im Beginn der Gastrulation, im Stadium des sichelförmigen Urmundes der Einwirkung von Sexualhormonen mit und ohne Kombination von SH-Glutathion ausgesetzt [1]. Alle Keime wurden 45—72 Stunden später fixiert. Die Kontrollkeime hatten in dieser Zeit die Gastrulation beendet. Die Auffaltung der Medullarwülste, der Verschluss des Neuralrohres und seine Einsenkung waren durchgeführt. Die Chorda hatte sich gesondert, die Ursegmente waren zum grossen Teil ausdifferenziert und ihr Stiel wies bereits eine Lichtung auf. Am Gehirnrohr zeigten sich die ersten Andeutungen der primären Augenblasen. Die Oestradiolkeime haben fast den Entwicklungsstand der Kontrollen erreicht. Allerdings erfolgte die Ausbildung des Neuralrohres und des dorsalen Mesoderms zum Teil sehr rudimentär. Die meisten Keime zeigen eine starke Pigmentauswanderung, vereinzelte weisen asymmetrische Entwicklungsrückstände auf. Auf der einen Seite findet man bereits ausgebildete Ursegmente, während die Gegenseite keine Differenzierungstendenz erkennen lässt. Stilboestrolkeime, nach 45 Stunden fixiert, stehen in ihrer Entwicklung weit zurück. Sie haben trotz Ausbildung einer Furchungshöhle die Gastrulation nicht beenden können. Die mit Glutathion behandelten Oestradioleier weisen in noch ausgesprochenerem Masse Entwicklungsfehlleistungen auf als die oben beschriebenen Oestradioleier.

Das Bild der differenzierten Mitosenauszählung entspricht der Entwicklungsleistung. Wir finden bei behandelten wie unbehandelten Eiern gleichhohe Prozentsätze von pathologischen Metaphasen und Ana-Telophasen. Die behandelten Hormoneier weisen zudem eine leichte Verzögerung des Mitosenablaufes auf. Die starken Schwankungen des Verteilungskoeffizienten zwischen Kopf- und Rumpfgebiet gehört zur charakteristischen Hormonwirkung. Die meisten abnormen Mitosen finden sich an Stellen starker Zellteilungsintensität.

[1] S. experimenteller Teil *i)*.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Einwirkung von Oestradiol und Stilboestrol auf die Entwicklung von Tritoneiern ist in früheren Veröffentlichungen eingehend beschrieben worden. Die dabei auftretenden Störungen der Zellteilungen führen zu einer unregelmässigen Verteilung der Chromosomen auf die entstehenden Tochterzellen. Bei abgesprengten Chromosomen und Chromosomenstücken, die, wenn sie ausserhalb des Teilungsraumes zu liegen kommen, aufgelöst werden, tritt noch ein Verlust an Kernsubstanz hinzu. Damit ist nicht nur der Genbestand der Einzelzelle gefährdet, sondern auch die für den dauernden Stoffumsatz notwendige Kern-Plasmarelation gestört. Die während der Primitiventwicklung auftretenden Fehlleistungen können somit z. T. auf die Bildung nicht ausbalancierter oder unvollständiger Chromosomensätze beruhen. Gleichartigen Verhältnissen begegnen wir bei den Bastardmerogonen. Kernwirkungen können auf allen Stadien der Primitiventwicklung Störungen hervorrufen. Dabei ist die durch die veränderte Kernzusammensetzung bewirkte Störung immer phasen- und organspezifisch. Sie betrifft selten das Determinationsgeschehen, das von Kernfaktoren weitgehend unabhängig zu sein scheint, häufig dagegen topogenetische Leistungen. Wie eingangs gezeigt wurde, sind diese Zentren topogenetischer Aktivität dadurch ausgezeichnet, dass sie eine starke Reaktion auf SH-Gruppen geben. In der Einzelzelle selber sind es vor allem die Zellgrenzen, in deren Nähe sich SH-Proteine anhäufen. Man findet sie vorzugsweise in Granula, die von Braschet (1944) isoliert, und von ihm und Claude (1940) untersucht worden sind. Diese bestehen zirca. zur Hälfte aus Lipoiden, der restliche Anteil aus Ribosenukleotiden, SH-Proteinen und verschiedenen Fermentsystemen. Dass diese Granula infolge ihres Lipoidgehaltes Steroide speichern können, liegt auf der Hand und ist auch experimentell bestätigt worden (Brachet, 1944). So könnten neben den sichergestellten Kernwirkungen auch direkte Schädigungen des Zellplasmas durch Beeinflussung dieser sekundären Stoffwechselzentren angenommen werden, was die Pigmentverschiebungen, die Auflösung der Zellgrenzen und andere plasmatische Zerfallsprozesse im Schnittbild erklären würde.

Diese Ueberlegungen haben unsere Versuche nicht bestätigen können. Den vorliegenden Ergebnissen ist zu entnehmen, dass eine Beeinflussung von SH-Gruppen durch die angewandten weiblichen Sexualhormone wohl denkbar ist, dass sie aber als primärer Angriffspunkt dieser Hormone kaum in Frage kommt. Wenn wir die einzelnen Versuchsresultate überblicken, können wir feststellen, dass mit Ausnahme der erst im Gastrulationsbeginn eingesetzten Keime alle übrigen hormonbehandelten Eier unter SH-Glutathionzusatz einen deutlich geringeren Prozentsatz geschädigter Mitosen aufweisen als die Hormonkontrollen. In einzelnen Versuchsreihen wird auch die zwar unspezifische Verlängerung des Mitosenablaufes teilweise normalisiert. Das Phasenbild allein darf jedoch nur mit Vorsicht beurteilt werden, da über die Dauer der Interphase und ihre zeitlichen Veränderungen keine Anhaltspunkte vorliegen. Mit der Abnahme pathologischer Mitosenbilder sinkt auch die Zahl abnormer Arbeitskerne und die Häufigkeit plasmatischer Degenerationserscheinungen.

Die Entwicklung dagegen wird nicht einheitlich beeinflusst. In einzelnen Fällen führt die Zugabe von SH-Glutathion zur teilweisen Rückbildung der Entwicklungsfehlleistungen, in anderen Fällen wird das Wachstum noch stärker verzögert, was zum frühzeitigen Keimtod führt. Die Keime, die nur der SH-Glutathionwirkung ausgesetzt waren, zeigen anfänglich eine leichte Beschleunigung, später aber eine entsprechende Wachstumshemmung. Die Mitosenverhältnisse sind normal.

Wie sollen wir die verschiedenartigen Ergebnisse deuten ? SH-Glutathion übt auf sich entwickelnde Eier von Triton alpestriseine gewisse Schutzfunktion gegenüber Oestradiol und Stilboestrol aus. Vom Gastrulationsstadium an fällt diese Schutzwirkung weg. Die Kombination Glutathion-Hormon wirkt zusätzlich toxisch auf die Keime ein, indem sie die Teilungsrate bei gleichzeitiger Besserung der Mitosenverhältnisse teilweise fast vollständig unterdrückt. Eine direkte Beeinflussung der zellständigen freien oder gebundenen SH-Gruppen durch das Hormon erscheint nach diesen Untersuchungen als unwahrscheinlich. Die Hormonwirkung, die in allen Entwicklungsstadien dieselbe bleibt, wird wohl vor der Gastrulation durch SH-Glutathion abgeschwächt, später aber nicht mehr beeinflusst.

Durch frühere Arbeiten ist bekannt geworden, dass Disulfide und S-S-Gruppen enthaltende Verbindungen die Teilungsrate

durch Hemmung des Mitoseeintrittes stark herabsetzen, vereinzelt sogar toxisch wirken können (Brachet, 1944). Tatsächlich finden wir bei den in der Entwicklung am stärksten beeinträchtigten Keime, die mit SH-Glutathion behandelt wurden, sehr niedrige Mitosenzahlen. Wir wissen ferner aus früheren Untersuchungen, dass Wasserstoff übertragende Fermentsysteme durch Hydrierung der Doppelbindungen im Hormonmolekül dessen Wirksamkeit aufheben können. So übt Vitamin C, das in seinem Redoxpotential dem Glutathion sehr nahe steht, in Gewebskulturen eine Schutzfunktion gegenüber einer Hormoneinwirkung aus (v. Möllendorf, 1939). Wir können daher vermuten, dass in unseren Versuchsserien, in denen durch Glutathionzusatz die Mitosenverhältnisse gebessert worden sind, die teilweise Aufhebung der Hormonwirksamkeit durch Hydrierung des Hormons stattgefunden hat, wobei das reduzierte Glutathion in die oxydierte Form übergegangen ist. Der Grad der Entgiftung wird wohl vom jeweiligen lokalen Stoffwechsel-geschehen, von den Permeabilitäts- und Diffusionsprozessen abhängen, die wir in ihrer Gesamtheit nicht zu überblicken vermögen. Eine Anhäufung von oxydiertem Glutathion dürfte durch die oben erwähnte Senkung der Teilungsrate starke Entwicklungsrückstände hervorrufen ohne dabei ausgeprägte pathologische Mitosenbilder zu erzeugen. Die Primitiventwicklung ist von tiefgreifenden Aenderungen im Stoffumsatz begleitet, die besonders zur Zeit der Gastrulation deutlich werden (Brachet, 1944). Es verwundert daher nicht, wenn Keime, die erst im Beginn der Gastrulation der kombinierten Glutathion-Hormoneinwirkung ausgesetzt sind, keine Entgiftung des angewandten Sexualhormons erkennen lassen. Die Umstellung des Stoffwechsels zu diesem Zeitpunkte kann sehr wohl eine Entgiftung des Hormons verhindern.

Auf Grund unserer Untersuchungsergebnisse dürfen wir annehmen, dass das SH-Glutathion in vivo in der Lage ist durch Hydrierung der Sexualhormone deren Wirksamkeit wenigstens teilweise abzuschwächen. Es kann in dieser Beziehung den hydrierenden Fermentsystemen zur Seite gestellt werden, die wie Ascorbinsäure in der Gewebskultur und bei der Feuerbohne eine Schutzwirkung gegen die Schädigung durch diese Hormone ausüben. Es erscheint wenig wahrscheinlich, dass der eigentliche Angriffspunkt dieser Hormone in der Beeiflussung von zellständigen,

freien oder gebundenen SH-Gruppen zu suchen ist. Die entgiftende Funktion von SH-Glutathionzusatz dürfte vermutlich viel eher in einer direkten Hydrierung der angewandten Hormone beruhen. Den eigentlichen Angriffspunkt der Sexualhormone aufzuklären muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

ZUSAMMENFASSUNG

1. SH-Glutathion hebt die Wirkung von Oestradiol und Stilboestrol auf die Primitiventwicklung von Tritoneiern bis zum Stadium der Gastrulation teilweise auf. SH-Glutathion allein zeigt in den frühen Stadien eine gewisse beschleunigende, später aber verlangsamende Wirkung auf die Primitiventwicklung.

2. Die Entgiftung dieser Sexualhormone dürfte auf dem Wege einer teilweisen Hydrierung erfolgen, bei der das Glutathion von der reduzierten in die oxydierte Form übergeht.

3. Dass der Angriffspunkt der angewandten Sexualhormone die freien oder gebundenen zellständigen SH-Gruppen sind, scheint nach unseren Untersuchungen unwahrscheinlich.

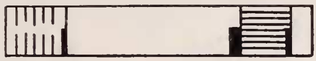
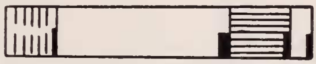
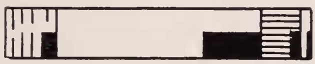
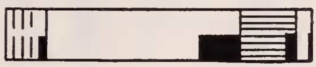
II. EXPERIMENTELLER TEIL

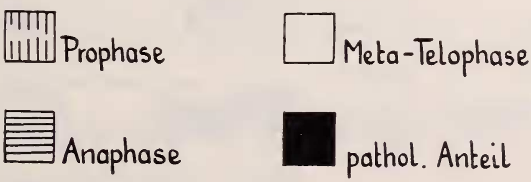
a) *Verhalten von SH-Glutathion in Brunnenwasser unter Luftzutritt. pH 6,8-7,2.*

Zeit in Stunden	ccm Lösung	1/100n J_2-Verbrauch in ccm Indikator: Stärke
	2.327 mg SH-Glutathion/ccm.	
0	5	3,20
2	5	3,30
20	5	3,30
40	5	3,25
65	5	3,15
72	5	3,25
96	5	3,23
	3,800 mg/ccm	
0	5	5,76
2	5	5,93
20	5	5,62
40	5	5,97

Nach 4 Tage zeigen beide Lösungen stark positive Nitroprussidnatriumreaktion.

b) *Eier ungeteilt eingesetzt, nach 60 Stunden fixiert Bouin, Temp. 20°, Paraffineinbettung über Methylbenzoatcelloidin, Schnittdicke 12μ. Färbung: Feulgen, Nachfärbung Wasserblau. Fixationsstadium: Gastrula.*

Wasser-keime	Absolute Mitosen-zahl	Mitosen-zahl p. Schnitt	Mittel-wert	Phasenprozentsätze
A_3	376	4,3		
A_4	296	3,9		
A_5	350	3,4	4,1 ± 0,5	
A_6	352	5,0		
GSH-Keime				
B_6	675	6,6		
B_7	249	2,9		
B_8	457	6,3	5,0 ± 1,4	
B_9	370	4,2		
Stil-boestrol				
1 : 800000				
. C_4	305	3,3		
C_5	395	4,9		
C_6	236	2,3	3,6 ± 0,7	
C_7	372	3,8		
Stilboest-rol-SH-Gluta-thion				
1 : 800000	1:80000			
D_5	253	4,1		
D_6	264	3,1	3,4 ± 0,4	
D_7	269	3,2		



Prozentsatz pathologischer Metaphasen und Ana- Telophasen.

Wasserkeime			GSH-Keime			Stilboestrol 1 : 800 000			Stilboestrol-GSH 1 : 800 000 1 : 80 000		
	M	AT		M	AT		M	AT		M	AT
A_3	5,3	5,0	B_6	5,7	6,9	C_4	29,3	32,2	D_5	16,3	14,2
A_4	3,3	7,2	B_7	3,4	12,5	C_5	33,1	46,7	D_6	12,7	22,0
A_5	3,8	—	B_8	5,0	10,3	C_6	19,8	23,9	D_7	17,5	20,2
A_6	3,2	2,2	B_9	6,4	5,4	C_7	25,4	14,6			
Mittel:											
	3,9	3,6		5,1	8,8		27,0	29,4		15,5	18,8
s:	±1,0	±3,3		±1,3	±3,2		±5,8	±13,6		±2,5	±4,1

c) *Eier ungeteilt eingesetzt, nach 66 Stunden Bouin fixiert, Temp. 20°, Paraffineinbettung über Methylbenzoatcelloidin, Schnittdicke 12μ, Färbung: Feulgen, Nachfärbung Wasserblau. Fixationsstadium: Neurula.*

Wasserkeime	Absolute M Mitosen-zahl	Mitosenzahl p. Schnitt		Mittelwert	
		Kopf Rumpf	Keim	Kopf/ Rumpf	Keim
A_{27}	135	0,7	1,5		
A_{28}	108	1,4	1,2	1,1 ±0,3	1,3 ±0,1
A_{29}	116	1,2	1,2		
Sitlboestrol 1 : 800000					
C_{16}	93	1,7	1,0		
C_{17}	103	1,1	0,8	1,3 ±0,3	1,2 ±0,4
C_{18}	151	1,1	1,8		
Stilboestrol-SH-Glutathion 1 : 800000	1 : 80000				
D_{11}	42	2,3	0,5		
D_{12}	399	2,3	3,4		
D_{13}	202	8,2	1,8	4,6 ±2,3	1,9 ±0,8
D_{14}	177	5,6	1,7		

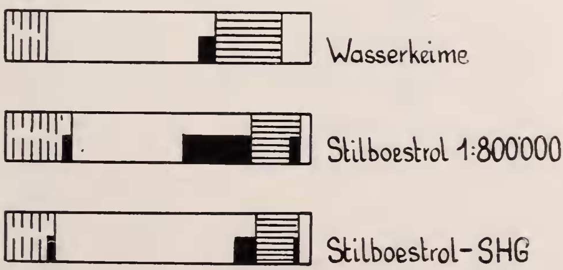
Verteilung pathologischer Meta- und Anatelophasen:

Wasserkeime		M	AT	Stilboestrol 1 : 800000	M	AT	Stilboestrol-GSH 1 : 800000, 1 : 80000	M	AT
A_{27}	Kopf	3,7	—	C_{16}	30,0	14,3	D_{11}	10,3	—
	Rumpf	8,3	—		34,5	16,7		—	—
	Keim	6,0	—		32,3	15,5		5,2	—
A_{28}		2,8	—	C_{17}	42,2	20,0	D_{12}	10,1	—
		3,4	—		32,0	—		9,5	—
		3,1	—		37,1	10,0		9,8	—
A_{29}		7,2	—	C_{18}	43,8	12,5	D_{13}	7,4	4,4
		—	—		32,3	—		10,0	—
		3,6	—		38,1	6,3		8,7	2,2
							D_{14}	12,7	—
								9,5	—
								11,1	—

Mittelwerte: ganzer Keim

	Wasserkeime M	Wasserkeime AT	Stilboestrol 1 : 800000 M	Stilboestrol 1 : 800000 AT	Stilboestrol-SHG 1 : 800000, 1 : 80000 M	Stilboestrol-SHG 1 : 800000, 1 : 80000 AT
	4,2	—	35,8	10,6	8,7	0,6
s:	±1,6	—	± 2,7	± 4,6	±2,5	

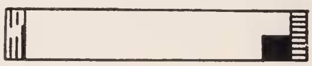
Phasenprozentsätze:



d) *Eier ungeteilt eingesetzt, nach 96 Stunden Bouin fixiert, Temp. 20°, Paraffineinbettung über Methylbenzoatcelloidin, Schnittdicke 12 µ, Färbung: Feulgen, Nachfärbung Wasserblau.*
Fixationsstadium: Gastrula.

Stilboestrol-SHG 1 : 800000, 1 : 80000	Absolute Mitosenzahl	Mitosenzahl p. Schnitt.	Mittelwert
d_{11}	48	0,4	
d_{12}	25	0,2	
d_{13}	12	0,1	0,2 ± 0,1
d_{14}	18	0,1	

Prozentsätze pathologischer Meta- und Ana-Telophasen:

Stilboestrol 1 : 800000, 1 : 80000	M	AT	Phasenprozentsatz
d_{11}	10,7	—	
d_{12}	6,3	—	
d_{13}	18,3	—	
d_{14}	7,2	—	
Mittelwert:	10,6	—	
s:	± 5,4	—	

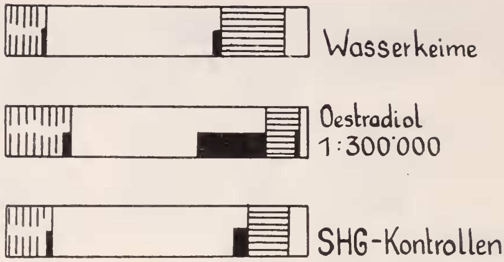
e) *Eier ungeteilt eingesetzt, nach 60 Stunden Bouin fixiert, Temp. 20°, Paraffineinbettung über Methylbenzoatcelloidin, Schnittdicke 12μ, Färbung: Feulgen, Nachfärbung Wasserblau. Fixationsstadium: Neurula.*

Wasserkeime	Absolute Mitosenzahl	Mitosenzahl p. Schnitt		Mittelwert	
		Kopf/Rumpf	Keim	Kopf/Rumpf	Keim
A_{19}	346	1,6	3,4		
A_{20}	214	1,6	2,1		
A_{21}	40	1,7	0,4	1,4 ± 0,3	1,7 ± 1,0
A_{22}	106	0,9	1,0		
SHG-Kontrollen 1 : 30000					
B_{14}	223	1,9	2,1		
B_{15}	212	1,4	2,6	1,6	2,3
Oestradiol 1 : 30000					
E_5	190	1,0	2,2		
E_6	232	1,5	2,1	1,5 ± 0,7	1,9 ± 0,3
E_7	171	2,0	1,5		
Oestradiol-SHG 1 : 300000, 1 : 30000					
F_{10}	7		0,07		
F_{11}	1				

Prozentsätze pathologischer Meta- und Ana-Telophasen:

Wasserkeime		M	AT	GSH-Kontrollen	M	AT	Oestradiol 1 : 300000	M	AT	Oestradiol-SHG 1 :300000,1 :30000
	Kopf	5,4	—		4,7	5,9		36,3	25,0	
A_{19}	Rumpf	2,8	—	B_{14}	4,0	—	E_5	41,6	—	zu wenig Mitosen zur Auszählung.
	Keim	4,1	—		4,3	3,0		39,0	12,5	
		3,5	—		6,9	—		33,3	—	
A_{20}		5,3	—	B_{15}	8,3	—	E_6	23,4	—	
		4,3	—		5,6	—		28,4	—	
		—	—					26,0	—	
A_{21}		—	—				E_7	25,0	—	
		—	—					25,5	—	
		3,2	—							
A_{22}		4,6	—							
		3,9	—							
Mittel:		3,1	—		6,0	7,5		31,0	3,1	
s:		± 1,2	—		± 2,3	± 1,5		± 7,1	± 7,3	

Phasenprozentsätze:



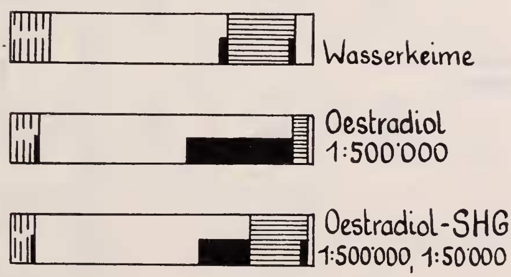
f) *Eier ungeteilt eingesetzt, nach 70 Stunden Bouin fixiert, Temp. 20°, Paraffineinbettung über Methylbenzoatcelloidin, Schnittdicke 12μ, Färbung: Feulgen, Nachfärbung Wasserblau.*
Fixationsstadium: Neurula.

Wasserkeime	Absolute Mitosenzahl	Mitosenzahl p. Schnitt		Mittelwert	
		Kopf/Rumpf	Keim	Kopf/Rumpf	Keim
A_{23}	215	1,7	2,5		
A_{24}	280	1,4	2,8		
A_{25}	266	1,8	2,3	1,6 ± 0,2	2,4 ± 0,2
A_{26}	253	1,4	2,1		
Oestradiol 1 : 500000					
E_8	526	1,2	4,7		
E_9	68	1,0	0,7	1,2	2,7
Oestradiol-SHG 1 : 500000, 1 : 50000					
F_{12}	258	2,0	2,5		
F_{13}	206	1,3	2,3		
F_{14}	194	2,5	2,2	1,9 ± 0,5	2,2 ± 0,3
F_{15}	251	1,2	2,7		
F_{16}	103	2,7	1,3		

Prozentsätze pathologischer Meta- und Ana-Telophasen:

Wasserkeime				Oestradiol 1 : 500000			Oestradiol-SHG 1 : 500000, 1 : 50000		
		M	AT		M	AT		M	AT
	Kopf	4,4	—		43,8	—		23,8	5,2
A_{23}	Rumpf	7,7	—	E_8	39,5	—	F_{12}	10,5	—
	Keim	6,0	—		41,7	—		17,2	2,6
		4,3	—		48,3	—		21,2	—
A_{24}		6,4	8,0	E_9	24,2	—	F_{13}	28,3	6,7
		5,3	4,0		30,6	—		24,7	3,4
		5,4	1,9					31,1	—
A_{25}		10,7	—				F_{14}	23,4	—
		8,0	0,9					27,2	—
		5,6	—					25,2	4,6
A_{26}		1,9	—				F_{15}	14,3	4,0
		3,8	—					9,5	4,3
								22,6	—
							F_{16}	9,5	11,1
								16,0	5,6
Mittel:		5,8	1,2		39,0	—		21,0	3,2
s:		±1,7	±1,9		± 2,7	—		± 4,8	±1,9

Phasenprozentsätze:



g) *Eier ungeteilt eingesetzt, nach 84 Stunden Bouin fixiert, Temp. 20°, Paraffineinbettung über Methylbenzoatcelloidin, Schnittdicke* 12μ, *Färbung: Feulgen, Nachfärbung Wasserblau.*
Fixationsstadium: Neurula.

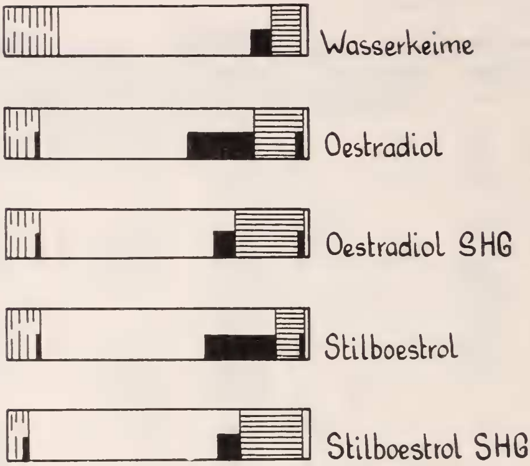
Wasserkeime	Absolute Mitosenzahl	Mitosenzahl p. Schnitt		Mittelwert	
		Kopf/ Rumpf	Keim	Kopf/ Rumpf	Keim
A_{30}	175	0,8	2,0		
A_{31}	127	1,3	1,4	1,1 ±0,2	1,6 ±0,2
A_{32}	168	1,2	1,5		
Oestradiol 1 : 400000					
A_{10}	168	3,0	2,0		
E_{11}	137	0,9	1,4		
E_{12}	106	2,0	1,0	2,1 ±0,5	1,4 ±0,3
E_{13}	162	2,0	1,5		
E_{14}	113	2,4	0,9		
Oestradiol-SHG 1 : 400000, 1 : 40000					
F_{17}	164	1,4	1,6		
F_{18}	179	2,2	1,9	1,6 ±0,2	1,5 ±0,3
F_{19}	92	1,6	1,5		
Stilboestrol 1 : 800000					
C_{12}	739	3,1	4,1		
C_{13}	390	2,9	4,5		
C_{14}	390	1,8	4,2	3,2 ±0,8	5,7 ±2,0
C_{15}	387	5,0	9,8		
Stilboestrol-SHG 1 : 800000, 1 : 80000					
D_{8}	325	1,7	2,3		
D_{9}	232	1,2	2,3	1,9 ±0,5	2,1 ±0,2
D_{10}	167	2,7	1,7		

Prozentsätze pathologischer Meta- und Ana-Telophasen:

Wasserkeime				Oestradiol 1 : 400000			Oestradiol-SHG 1 : 400000, 1 : 40000		
		M	AT		M	AT		M	AT
	Kopf	6,8	—		33,8	11,1		9,5	—
A_{30}	Rumpf	5,8	—	E_{10}	36,7	—	F_{17}	2 ,0	—
	Keim	6,3	—		35,3	5,6		5,8	—
		8,0	—		31,8	11,1		7,6	11,4
A_{31}		7,2	—	E_{11}	22,4	—	F_{18}	6,2	9,1
		7,6	—		26,6	5,6		6,9	10,3
		10,6	—		29,3	—		13,0	7,7
A_{32}		5,8	—	E_{12}	25,9	—	F_{19}	13,9	—
		8,2	—		27,6	—		13,5	3,9
					34,3	3,3			
				E_{13}	17,1	—			
					25,7	1,7			
					35,3	—			
				E_{14}	25,9	—			
					30,6	—			
Mittel:		7,2	—		29,2	2,6		8,7	4,7
s:		± 0,9	—		± 3,9	± 2,1		± 4,2	± 4,7

Stilboestrol 1 : 800000				Stilboestrol-SHG 1 : 800000, 1 : 80000		
		M	AT		M	AT
	Kopf	41,4	—		12,9	—
C_{12}	Rumpf	33,2	—	D_8	6,4	2,6
	Keim	37,3	—		9,7	1,3
		34,5	—		8,9	—
C_{13}		12,3	4,5	D_9	12,7	—
		23,3	2,3		10,8	—
		35,0	5,9		7,8	—
C_{14}		24,4	14,3	D_{10}	10,4	—
		29,7	10,1		9,1	—
		40,8	4,5			
C_{15}		23,7	—			
		32,3	2,3			
Mittel:		30,7	3,7		9,9	0,4
s:		± 5,8	± 3,7		± 0,9	—

Phasenprozentsätze:



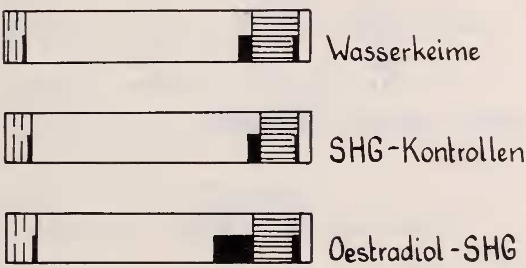
h) *Eier ungeteilt eingesetzt, nach 100 Stunden Bouin fixiert, Temp. 20°, Paraffineinbettung über Methylbenzoatcelloidin, Schnittdicke 12 µ, Färbung: Feulgen, Nachfärbung Wasserblau. Fixationsstadium: Neurula.*

Wasserkeime	Absolute Mitosenzahl	Mitosenzahl p. Schnitt		Mittelwert	
		Kopf/Rumpf	Keim	Kopf/Rumpf	Keim
A_{11}	218	1,4	2,3		
A_{12}	260	1,2	3,1		
A_{13}	249	0,8	2,7	1,1 ± 0,2	2,5 ± 0,3
A_{14}	207	1,0	2,0		
SHG-Kontrollen					
B_{10}	161	0,8	1,5		
B_{11}	242	1,0	2,4		
B_{12}	240	1,7	2,4	1,4 ± 0,5	2,2 ± 0,3
B_{13}	203	2,0	2,3		
Oestradiol-SHG 1 : 300000/1 : 30000					
F_1	308	1,7	3,0		
F_2	198	1,3	1,3		
F_3	167	2,9	1,6	2,1 ± 0,5	3,1 ± 1,5
F_4	563	2,5	5,7		

Prozentsätze pathologischer Meta- und Ana-Telophasen:

	Wasserkeime M	Wasserkeime AT		SHG-Kontrollen 1 : 30000 M	SHG-Kontrollen 1 : 30000 AT		Oestradiol-SHG 1 : 300000, 1 : 30000 M	Oestradiol-SHG 1 : 300000, 1 : 30000 AT
Kopf	6,4	—		2,3	10,0		16,3	—
A_{11} Rumpf	3,9	11,1	B_{10}	8,6	6,7	F_1	13,9	—
Keim	5,9	5,2		5,4	8,3		15,1	—
	4,9	—		2,9	—		12,7	—
A_{12}	6,1	4,6	B_{11}	5,8	10,0	F_2	11,7	—
	5,5	2,3		4,3	5,0		11,9	—
	6,4	—		5,5	—		22,0	34,0
A_{13}	1,0	—	B_{12}	4,7	—	F_3	18,2	—
	3,7	—		5,0	—		20,1	17,0
	5,6	—		2,3	—		25,8	2,9
A_{14}	3,5	—	B_{13}	6,2	—	F_4	17,9	10,0
	4,6	—		4,3	—		21,9	6,5
Mittel:	4,8	1,9		4,8	3,3		17,3	5,9
s:	±0,8	± 2,5		±0,6	± 4,1		± 4,6	± 6,6

Phasenprozentsätze:



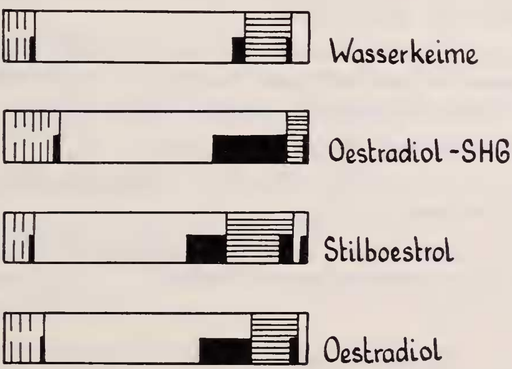
i) *Eier als Gastrula mit sichelförmigem Urmund eingesetzt, nach 45 und 72 Stunden Bouin fixiert, Temp. 20°, Paraffineinbettung über Methylbenzoatcelloidin, Schnittdicke 12 μ, Färbung: Feulgen, Nachfärbung Wasserblau. Fixationsstadium: Neurula.*

Wasserkeime	Absolute Mitosenzahl	Mitosenzahl p. Schnitt		Mittelwert	
		Kopf/ Rumpf	Keim	Kopf/ Rumpf	Keim
A_7	324	1,5	3,7		
A_8	288	3,2	4,7		
A_9	328	1,1	3,1	1,7 ±0,7	3,3 ±0,7
A_{10}	188	1,2	1,9		
Stilboestrol 1 : 800000					
C_9	139		2,1		
C_{10}	457		4,5	2,	2,6 ±1,2
C_{11}	221		1,3		
Oestradiol 1 : 300 000					
E_1	217	2,1	2,9		
E_2	207	1,8	1,7		
E_3	151	3,5	1,5	2,3 ±0,6	1,5 ±0,5
E_4	48	1,8	0,5		
Oestradiol-SHG 1 : 300000, 1 : 30000					
F_5	131	1,3	1,4		
F_6	152	0,8	1,5		
F_7	142	1,1	1,4	0,7 ±0,2	1,4 ±0,4
F_8	028	0,5	0,3		
F_9	218	1,0	2,4		

Prozentsätze pathologischer Meta- und Ana-Telophasen:

Wasserkeime	M	AT	Stilboestrol 1 : 800000	M	AT	Oestradiol 1 : 300000	M	AT	Oestradiol-SHG 1 :300000,1 :30000	M	AT
Kopf	5,0	—		13,3	18,7		9,5	11,1		20,0	—
A_7 Rumpf	2,7	4,2	C_9	17,9	75,0	E_1	16,0	—	F_5	25,6	—
Keim	3,9	2,1		15,6	46,8		17,8	5,6		22,8	—
	3,3	—		13,2	7,3		20,3	3,6		26,7	20,0
A_8	3,8	—	C_{10}	14,0	8,1	E_2	18,0	—	F_6	15,8	—
	5,6	—		13,6	7,6		19,2	1,8		21,3	10,0
	5,3	—		33,3	5,3		19,7	—		18,3	—
A_9	3,6	—	C_{11}	12,3	—	E_3	24,3	14,3	F_7	34,5	—
	4,4	—		22,8	2,7		22,0	7,2		26,4	—
	1,6	—					21,0	—		28,6	—
A_{10}	6,0	9,1				E_4	41,7	—	F_8	40,0	—
	3,8	4,6					31,4	—		34,3	—
										31,5	—
									F_9	36,3	—
										33,9	—
Mittel:	4,4	1,7		17,3	19,0		22,6	3,7		27,7	2,0
s:	±0,8	±2,2		± 4,9	23,5		± 5,8	± 3,3		± 6,1	± 4,5

Phasenprozentsätze:



LITERATURANGABEN

1929. Anson M. und Mirsky A., J. gen. Physiol. *13*, 121, cit. nach J. Brachet. Embryologie chimique.

1935. Berenblum I. J. Path. Bact. *40*, 549, cit. nach J. Brachet. Embryologie chimique.

1944. Brachet J. *Embriologie chimique*. S. 460. Masson, Paris.

1929. Hamett F. S. *The chemical stimulus essential for growth by increase in cell nomber.* Protoplasma 7, 297.

1938. Hopkins und Morgan. Biochem J. *32*, 611. *The influence of Thiol. groups in the activity of dehydrogenases.*

1945. Lehmann F. *Einführung in die phys. Embryologie.* S. 304. Birkhäuser, Basel.

1939. V. Möllendorf W. *Fortgesetzte Untersuchungen über den Einfluss von Kohlenwasserstoffen und Steroiden auf das Wachstum.* Z. Zellforsch. *29*, 35.

1943. —— *Der Einfluss von wasserlöslichen Vitaminen auf die durch Steroide und cancerogene Kohlenwasserstoffe in Gewebekulturen bewirkte Teilungsstörung.* Z. Zellforsch. *32*, 445.

1940. Miller E. und Reimann, P. Arch. Path. *29*, 181, cit. nach J. Brachet: Embryologie chimique.

1938. Owen, S. Weiss, H. und Prince, L. Science *87*, 261, cit. nach J. Brachet: Embryologie chimique.

1938. Rapkine, L. Biochem. J. *32*, 1729. *Sulphydryl groups and enzymic oxido-reduction.*

1938. Schönmann, W. *Der diploide Bastard Triton palmatus ♀ × Salamandra ♂.* Roux' Archiv. *138*.

1941. Töndury, G. *Die Beeinflussung der Neurulation bei Triton durch Testosteron und verwandte Substanzen.* Roux' Arch. *141*.

1943. —— *Ueber die Beeinflussung der Eientwicklung durch weibliche Sexualhormone.* Roux' Arch. *142*, 1.

1935. Voegtlin, C. und Chalkley, H.W. *The chemistry of cell division. Protoplasma* 24, *365*.

1940. Wood, J. und Fieser, L. J. Amer. Chem. Suc. *62*, 2675, cit. nach Brachet: Embryologie chimique.